

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : **2 747 131**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **96 04415**

(51) Int Cl⁶ : C 12 P 13/14, C 12 P 13/08 // C 12 N 15/77 (C 12 P
13/14, C 12 R 1:13, 1:15)

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

(22) Date de dépôt : 09.04.96.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 10.10.97 Bulletin 97/41.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : *ORSAN SOCIETE ANONYME — FR.*

(72) Inventeur(s) : WOJCIK FRANCK et ZULIANI
VINCENT.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : REGIMBEAU.

(54) **PROCEDE DE PRODUCTION D'AMINO ACIDE PAR FERMENTATION DE CORYNEBACTERIE EXPRIMANT
UNE ACTIVITE TREHALASE.**

(57) La présente invention concerne un procédé de pro-
duction d'acide aminé, notamment d'acide glutamique par
fermentation d'un milieu de culture comprenant des sucres,
à l'aide de corynébactérie produisant ledit acide aminé, ca-
ractérisé en ce qu'on utilise une souche de corynébactérie
transformée de manière à obtenir une souche recombi-
nante exprimant une activité hydrolysant le tréhalose.

FR 2 747 131 - A1



PROCEDE DE PRODUCTION D'AMINO ACIDE
PAR FERMENTATION DE CORYNEBACTERIE EXPRIMANT
UNE ACTIVITE TREHALASE

5 La présente invention concerne un procédé de production d'acide aminé par fermentation à l'aide de corynébactérie.

Les corynébactéries, sont l'espèce bactérienne la plus utilisée, notamment Corynebacterium glutamicum, pour la production d'acides
10 aminés par fermentation, en particulier l'acide glutamique. Généralement, la concentration finale de glutamate et son rendement d'obtention détermine la qualité des souches de production. L'augmentation du rendement de production résulte d'une utilisation plus efficace du substrat fermenté. Parallèlement à la consommation du
15 substrat pour la croissance et la maintenance bactérienne, l'utilisation de ce substrat pour la synthèse de coproduits autres que celui désiré doit être aussi minime que possible. Ainsi, la dégradation d'un coproduit en une substance consommable optimise l'utilisation du substrat fermenté.

20 La production d'acide aminé par les corynébactéries (*Corynebacterium* ou *Brevibacterium* sp.) à partir de sucres purs (saccharose, glucose, fructose, etc...) ou de milieux nutritifs plus complexes en comprenant (mélasse de betterave, de canne, etc...), est généralement accompagnée d'une coproduction jusqu'à plusieurs
25 grammes par litre d'un disaccharide non réducteur, le tréhalose (α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside) (Marquet et al. 1986). La fonction physiologique de ce sucre n'est pas clairement identifiée et fait l'objet de plusieurs études scientifiques (Frings et al., 1993). Outre la perte de carbone assimilable pour la production d'acide aminé, la coproduction de
30 tréhalose peut éventuellement diminuer les rendements de purification de l'acide aminé.

De nombreuses souches de corynébactéries sont incapables de consommer le tréhalose, soit comme seule source de carbone, soit en
35 association avec une autre source de carbone.

D'autres micro-organismes sont pourtant capables d'utiliser le tréhalose pour leur croissance. C'est le cas d'Escherichia coli où il a été montré l'existence d'un enzyme, la tréhalase, capable d'hydrolyser le tréhalose en deux molécules de glucose (Becerra de Lares et al., 1977). Chez
5 ce micro-organisme, la localisation de cet enzyme est périsplasmique (Boos et al., 1987). Le fragment d'ADN gouvernant la synthèse de cet enzyme a été isolé (gène *treA*) et sa séquence nucléotidique déterminée (Gutierrez et al., 1989). Sur cet ADN, les séquences nécessaires à la sécrétion de l'enzyme ("peptide signal") ont été identifiées. Par ailleurs, il a été montré qu'un
10 certain nombre de ces séquences de sécrétion provenant de micro-organismes autres que les corynébactéries pouvaient être fonctionnelles chez Corynebacterium glutamicum (Liebl et al., 1992).

La demande de brevet JP 4004888 décrit la préparation d'un acide
15 aminé dans une culture microbienne contenant du tréhalose.

La présente invention consiste à exprimer ou surexprimer chez les corynébactéries une activité enzymatique hydrolysant le tréhalose notamment via l'expression d'un gène *treA* en particulier le gène *trhA*
20 provenant d'E.coli. Les souches bactériennes ainsi transformées acquièrent la capacité d'hydrolyser le tréhalose en glucose. Cette nouvelle fonction enzymatique permet d'augmenter significativement les rendements de production en acide aminé.

25 Plus précisément, la présente invention a pour objet un procédé de ~~production d'acide aminé par fermentation d'un milieu de culture~~ comprenant des sucres, à l'aide d'une corynébactérie produisant ledit acide aminé caractérisé en ce qu'on utilise une souche recombinante de corynébactérie transformée de manière à exprimer une activité
30 enzymatique hydrolysant le tréhalose.

On entend ici par activité "hydrolysant le tréhalose" une définition fonctionnelle qui inclut toute activité tréhalase capable de fonctionner dans une corynebactérie hôte, lui conférant une activité éventuellement accrue et capable de fonctionner éventuellement comme marqueur de sélection. Cette définition inclut donc toute tréhalase capable de
5 fonctionner dans une corynebactérie donnée pour accroître l'activité tréhalase de ladite corynebactérie. Ce terme inclut donc non seulement l'enzyme endogène spécifique de la corynebactérie spécifique à traiter, si elle existe, mais toute autre enzyme tréhalase d'autres micro-organismes
10 ou même espèces eucaryotes, si cette tréhalase est capable de fonctionner dans les corynebactéries à traiter.

L'obtention de souches recombinantes de corynebactéries exprimant une activité hydrolysant le tréhalose peut être obtenue par
15 différentes approches en introduisant par les méthodes du génie génétique :

1. une ou plusieurs copies d'un gène de tréhalase exogène dans des conditions permettant son expression et sa sécrétion dans ladite corynebactérie ou ;
- 20 2. un promoteur exogène plus fort que le promoteur constitutif du gène de la tréhalase lorsque la corynebactérie possède cette activité tréhalase de manière endogène.

Dans le mode de réalisation préféré selon la présente invention,
25 ladite souche de corynebactérie exprime et sécrète dans le milieu de culture, une activité tréhalase hydrolysant le tréhalose en glucose.

Ladite souche de corynebactérie peut être transformée par un plasmide réplcatif comportant une cassette d'expression et de sécrétion
30 d'un fragment d'ADN codant pour l'enzyme tréhalase.

On entend ici par "fragment d'ADN codant pour l'enzyme tréhalase" un gène fonctionnel codant pour ladite tréhalase qui peut correspondre à la séquence d'ADN complète codant pour ledit enzyme ou une séquence
35 plus courte que la séquence codante totale. En particulier, le "gène fonctionnel" pourra correspondre à une séquence codante partielle dépourvue d'éventuels introns.

Récemment, on a pu mettre en évidence la possibilité de transformer des corynébactéries par des méthodes d'électroporation. Toutefois, si les techniques de transformation par vecteur autorépliquatif sont intéressantes, il est préférable la plupart du temps, et au niveau industriel, de disposer de bactéries qui ont été transformées par intégration dans le chromosome, c'est-à-dire des souches qui sont stables dans le temps, tant quant au nombre de copies de l'élément intégré que quant à sa localisation. Ladite souche de corynébactérie peut donc avantageusement être transformée par intégration chromosomique d'une cassette d'expression et de sécrétion contenant un fragment d'ADN codant pour l'enzyme tréhalase.

On entend par "cassette d'expression et de sécrétion", une cassette contenant une première séquence d'ADN fonctionnelle pour l'expression dans ladite souche de corynébactérie d'une seconde séquence d'ADN qui code pour l'enzyme tréhalase, et une troisième séquence d'ADN insérée entre lesdites première et seconde séquences d'ADN qui codent pour des éléments d'une protéine qui assurent la sécrétion de la tréhalase par ladite souche de corynébactérie.

Par "séquence fonctionnelle pour l'expression", on entend que le gène codant la Tréhalase est placé sous le contrôle de séquences régulatrices appropriées pour sa transcription et sa traduction telles que promoteur, codons "start" et "stop", enhancer, opérateur le cas échéant.

Dans un mode de réalisation particulier, lesdits fragments d'ADN assurant l'expression et la sécrétion de l'enzyme tréhalase sont constitués par les fragments d'ADN assurant l'expression et la sécrétion de la tréhalase dans un hôte d'origine.

Selon un mode de réalisation, l'origine tréhalase est l'enzyme tréhalase de *E.coli*.

Selon une variante appropriée, ladite souche est transformée par le gène *treA* de *E.coli* dans sa totalité, c'est-à-dire qui comporte ses propres éléments d'expression et de sécrétion de tréhalase.

Il doit tout d'abord être compris que dans le cadre de la présente invention la terminologie "corynébactérie" désigne non seulement les souches du genre Corynebacterium mais également les bactéries apparentées, telles que Brevibacterium.

5

Parmi les souches de corynébactéries utilisables, il faut citer plus particulièrement :

- B. lactofermentum,
- B. flavum,
- 10 - C. glutamicum,
- C. melassecola
- C. crenatum

pour leur intérêt industriel.

15

Parmi les acides aminés que l'on peut produire par le procédé de l'invention, on cite plus particulièrement l'acide glutamique et la lysine.

20

De préférence, on utilise une souche de C. glutamicum notamment la souche déposée à la CNCM de l'Institut Pasteur sous le n° I-1676.

De préférence, ladite souche est transformée par un fragment d'ADN en multi-copie codant pour l'enzyme tréhalase.

25

Dans un mode de réalisation, ladite souche de corynébactérie est transformée par un vecteur d'intégration comportant :

- un gène assurant une sélection efficace de ladite corynébactérie ;
- une séquence identique ou homologue du génome de ladite corynébactérie, et
- 30 - ladite cassette d'expression et sécrétion du fragment d'ADN codant pour l'enzyme tréhalase et sa sécrétion dans le milieu de culture.

35

Par "vecteur d'intégration", on entend désigner un vecteur non répliatif ayant la propriété de s'intégrer dans le génome d'une corynébactérie, ce vecteur pouvant être sous forme linéaire ou circulaire.

Toutefois, le vecteur d'intégration provient, en général, d'un plasmide autorépliquatif qui permet la synthèse dans un hôte différent, E.coli par exemple. Mais avant l'étape d'intégration, on supprimera, de préférence, toutes les séquences impliquées dans la réplication plasmidique chez la corynébactérie.

Les gènes de sélection efficaces dans lesdites corynébactéries sont :

- soit des gènes de résistance à une substance particulière, antibiotique notamment,
- soit des gènes conférant un phénotype clairement identifiable, coloration et/ou complémentation par exemple.

Dans le cas présent, la sélection par résistance à un antibiotique est plus particulièrement intéressante. Ainsi, on pourra utiliser :

- le gène *AphIII* conférant la résistance à la kanamycine, noté Km^R, ou à la néomycine, noté Neo^R,
- le gène *Cat* conférant la résistance au chloramphénicol, noté Cm^R.

Mais d'autres gènes peuvent être utilisés, notamment la résistance à l'érythromycine, à la tétracycline, à l'ampicilline, à la streptomycine, à la spectinomycine et à la bléomycine ou leurs analogues.

Par "séquence homologue", on entend désigner des séquences qui correspondent à celles présentes dans la corynébactérie transformée ou qui présentent un taux d'homologie supérieur à 80 %, il peut s'agir de séquences de la même espèce ou non, ces séquences peuvent d'ailleurs être chimiques.

Les séquences devront être adaptées ou non, c'est-à-dire tenir compte des problèmes de barrières de restriction existant chez les corynébactéries, par des procédés connus de l'homme de l'art.

Grâce à la présence de séquences homologues présentes simultanément dans le vecteur d'intégration et dans le génome, le vecteur d'intégration va s'insérer par recombinaison dans le chromosome. Ainsi, dans le transformant primaire, le gène de la tréhalase se retrouve intégré en une seule copie dans le chromosome bactérien. Comme la structure de l'intégrant primaire correspond à une duplication en tandem directe des séquences homologues encadrant le gène de sélection, il est possible de prévoir une amplification de cette structure par sélection de la croissance de l'intégrant primaire sur un milieu permettant de détecter les souches surexprimant le gène de sélection. Ainsi, lorsque le gène de sélection est le gène de résistance à un antibiotique, on peut sélectionner les souches les plus résistantes, sur milieux avec une teneur croissante en antibiotique, lesquelles souches devront surexprimer des gènes correspondant aux séquences homologues, mais également à tout gène ou séquence d'ADN qui a été inséré dans le vecteur d'intégration notamment le gène *treA*.

L'activité du gène *treA* peut également permettre de par sa plus forte expression la sélection de souche ayant une amplification de la structure.

20

Dans un mode de réalisation, ladite souche est une souche de *C.glutamicum* transformée par recombinaison homologue au locus *gdhA* du chromosome de la souche à l'aide de la cassette intégrative contenant les gènes *aphIII-treA-gdhA*, de sorte que le locus *gdhA* du chromosome des souches ayant intégré ladite cassette comporte les gènes : $gdhA\{aphIII-treA-gdhA\}_n$, n est un entier supérieur ou égal à 1.

25

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaitront à la lumière de la description détaillée des exemples qui vont suivre. Dans ces exemples, on se référera aux figures 1 à 4.

30

La figure 1 représente la construction du plasmide pFW3 à partir des plasmides pTRE15 et pCGL426.

35

La figure 2 représente le schéma de principe de l'intégration et de l'amplification chez les corynébactéries.

La figure 3 représente la construction d'une cassette intégrative contenant les gènes *aphIII-treA-gdhA* à partir de pCGL548 et pFW3.

La figure 4 représente l'intégration d'une cassette *aphIII-treA-gdhA* dans le chromosome de la souche COM1010 et la structure chromosomique des souches résultantes.

EXEMPLE 1: Construction d'un plasmide permettant l'expression du gène *treA*

Le plasmide pTRE15 (Figure 1) (Gutierrez et al., 1989) portant l'intégralité du gène *treA* d'E.coli ne possède pas d'origine de réplication permettant son maintien chez les corynébactéries. A partir de ce plasmide, un fragment PstI-EcoRI de 2,6 Kb a donc été sous-cloné selon les techniques décrites par Ausubel et al. (1987) dans le plasmide pCGL426 (Figure 1) aux sites Pst-EcoRI pour former le plasmide pFW3 (Figure 1). Le plasmide pCGL426 est un plasmide dérivatif de pCGL243 décrit par Reyes et al. (1991). Ce plasmide contient diverses origines de réplication dont ori p15A (Rose, 1988) et ori pBL1 (Santamamria et al., 1984), permettant son maintien sous forme répllicative libre respectivement chez E.coli et chez C. glutamicum. Le plasmide pFW3 a ainsi été sélectionné dans une souche d'E.coli K12 grâce au gène *aphIII* lui conférant une résistance à la kanamycine.

Après extraction et vérification, le plasmide pFW3 a été successivement introduit dans les souches B. lactofermentum CGL2002 puis C. glutamicum ATCC17965 et C. Glutamicum COM1010 par électrotransformation (Bonamy et al., 1990). Les souches ainsi transformées ont été sélectionnées sur milieu complet (BHI) additionné de kanamycine (25 µg/ml).

EXEMPLE 2 : Phénotype des corynébactéries transformées par le plasmide pFW3

La présence du plasmide pFW3 dans les souches de C. glutamicum confère à ces dernières la capacité de croître sur milieu minimum synthétique (Liebl et al., 1989) BMGtre contenant du tréhalose comme unique source de carbone (milieu BMGtre) (tableau 1).

Sur milieu solide gélosé, il a été observé qu'une souche de C. glutamicum non transformée pouvait croître sur milieu BMGtre si cette dernière était à proximité (quelques centimètres) d'une souche transformée par le plasmide pFW3. Cette observation met en évidence la capacité des souches transformées à excréter la tréhalase dont l'activité permet une croissance d'une souche non transformée sur milieu BMGtre.

15

La sécrétion du produit du gène treA par la souche de C. glutamicum ATCC17965 a été démontrée et quantifiée par la mesure d'une activité tréhalase dans le milieu de culture de cette souche transformée par le plasmide pFW3 (Tableau 2). Le dosage de cette activité a été réalisé selon un protocole adapté de Kienle et al. (1993). La souche ATCC 17965 transférée par pFW₃ a été déposée à la CNCM de l'Institut Pasteur sous le n° I-1676.

20

EXEMPLE 3 : Utilisation en fermentation de corynébactéries transformées par le plasmide pFW3

25

Une étude de fermentation permet de mettre en évidence l'amélioration de la production d'acide glutamique apportée par l'utilisation de souches de C. glutamicum transformées par le plasmide pFW3. Les capacités de production de différentes souches de C. glutamicum sur différents milieux de fermentation sont rapportées dans le tableau 3. Quelle que soit la souche de C. glutamicum transformée par le plasmide pFW3, la totalité du tréhalose coproduit dans ces conditions est hydrolysée et reconsommée. Le même effet est observé quelle que soit la source de carbone utilisée pour la réalisation des fermentations. Ainsi le gain de carbone assimilable par ces différentes souches transformées permet d'augmenter le rendement de production de l'acide glutamique.

30

35

EXEMPLE 4 : Intégration en multi-copies du gène *treA* dans le chromosome d'une souche de *C. glutamicum*

a) Nécessité et principe de l'intégration génomique

5

Le maintien du plasmide pFW3 dans les souches transformées nécessite l'addition de kanamycine ou de néomycine dans les milieux de culture de ces souches. Toutefois, cette addition d'antibiotique n'est pas envisageable industriellement car le coût des antibiotiques est d'une part
10 prohibitif et d'autre part leur utilisation en importante quantité est indésirable pour des raisons tant sanitaires qu'environnementales.

Afin d'éviter cette utilisation d'antibiotiques en conditions industrielles, le gène *treA* est intégré dans le génome des souches de *C.*
15 *glutamicum* selon la méthode décrite par Reyes et al. (1991) et Labarre et al. (1993) et WO92 202627. Schématiquement, ces auteurs ont montré que l'introduction dans une corynébactérie d'un fragment d'ADN circulaire, ne contenant aucune origine de répllication plasmidique (homologue ou hétérologue) et présentant une homologie importante avec le génome de
20 la souche en question peut s'intégrer dans son chromosome via un mécanisme de recombinaison homologue. Expérimentalement, la sélection des souches contenant de telles insertions est réalisée à l'aide d'un gène de résistance à un antibiotique additionné au fragment d'ADN intégré. Les auteurs ont également montré qu'à partir de souches possédant une
25 unique intégration, il peut être isolé des colonies bactériennes contenant dans leur génome une multiplication "en tandem" de cette intégration, intégration alors dite "amplifiée". La plus forte expression des gènes ainsi "multipliés" permet la sélection de ce type de colonies. L'ensemble du processus est représenté sur la Figure 2.

30

Les travaux de Reyes et al., 1991 et Labarre et al., 1993 ont également montré que les intégrations géniques présentent une importante stabilité. Cette stabilité est suffisamment grande pour permettre l'utilisation industrielle de souches bactériennes ainsi transformées sans maintien
35 d'une pression de sélection.

b) Intégration du gène *treA* dans le génome d'une souche de C. glutamicum

L'intégration génomique repose sur l'utilisation d'un fragment
5 d'ADN présentant de forte homologie avec le génome de C. glutamicum.
Dans l'exemple présenté ici, cette homologie est apportée par le plasmide
pCGL548 (Figure 3), dérivé du plasmide pCGL100 (Reyes et al., 1991),
portant l'intégralité du gène *gdhA* de C. glutamicum ATCC17965
gouvernant la synthèse de la glutamate déshydrogénase.

10

Afin de construire une structure circulaire capable de s'intégrer
dans le génome de C. glutamicum comme précédemment décrit, le plasmide
pFW3 (Figure 3) a été hydrolysé par *SacI*, traité par la T4 DNA polymérase
puis à nouveau hydrolysé par *EcoRI* ; le fragment de 4.08 Kb ainsi obtenu a
15 été purifié sur gel (Ausubel et al., 1987). Le plasmide pCGL548 a été
hydrolysé par *PvuII* et *EcoRI* et le fragment de 2,69 Kb contenant le gène
gdhA a également été purifié sur gel. Ces deux fragments ont été ligaturés
par action d'une T4 DNA Ligase (Figure 3) pour donner une structure
d'ADN circulaire intégrative.

20

Ce produit de ligation a été utilisé pour transformer la souche C.
glutamicum COM1010. Après sélection en milieu complet (BHI) en présence
de kanamycine (25 µg/ml) quelques clones, dont la souche COM2218, ont
été sélectionnés. Un test de croissance a permis de montrer que ces clones
25 sont capables de croître sur milieu BMCtre. Une analyse par Southern Blot
(Ausubel et al., 1987) à partir de l'ADN génomique de la souche COM2218 a
permis de confirmer l'intégration physique des gènes *aphIII-treA-gdhA*
au locus *gdhA* de la souche. La structure génomique ainsi créée est
représentée sur la Figure 4.

30

Afin d'obtenir une souche "amplifiée" pour l'intégration *aphIII-*
treA-gdhA, la souche COM2218 a été cultivée en milieu complet contenant
de la néomycine à des concentrations comprises entre 0,5 et 10 mg/ml.
Bien qu'initialement la souche COM2218 croît difficilement à ces
35 concentrations d'antibiotiques, quelques clones peuvent être isolés après
plusieurs jours de croissance.

Une mesure d'activité tréhalase présente dans le surnageant de culture des clones pris individuellement a permis de sélectionner la souche COM2218A14. En effet, le niveau d'activité tréhalase qu'elle exprime est supérieur à celui retrouvé avec la souche parentale COM2218 (voir Tableau 6). Une analyse par "Southern blot" à partir de l'ADN génomique de la souche COM2218A14 a permis de confirmer l'amplification à six copies du tandem *aphIII-treA-gdhA* au locus *gdhA* de la souche.

10 EXEMPLE 5 : Utilisation en fermentation d'une corynébactérie COM2218A14 ayant intégré le gène *treA* en multi-copies

Une étude de fermentation permet de mettre en évidence l'amélioration de la production d'acide glutamique apportée par l'utilisation de souches de *C. glutamicum* ayant intégré dans leur génome une ou plusieurs copies du gène *treA* (voir Tableau 7). Cette fermentation est réalisée comme précédemment décrit exceptée l'absence d'antibiotique dans les différents milieux de culture utilisés.

20 L'utilisation de la souche COM2218 qui ne possède qu'une seule copie intégrée du gène *treA*, coproduit en final une quantité de tréhalose réduite mais non nul. Le rendement de production de l'acide glutamique par rapport à la source de carbone utilisée est toutefois augmenté. L'utilisation de la souche COM2218A14 qui possède six copies du gène *treA* intégrées, permet une production d'acide glutamique sans tréhalose résiduel en fin de production malgré sa coproduction en importantes quantités pour la souche originelle. Ainsi, le gain de rendement de production est optimal dans ces conditions.

30 EXEMPLE 6 : Construction et utilisation d'une corynebactérie COM2386 ayant intégré le gène *treA* en multi-copies.

35 La versatilité de l'invention est montrée avec l'intégration du gène *treA* dans le génome d'une autre souche de corynébactérie. L'exemple décrit une variante des techniques d'intégration et de sélection que celles utilisées dans l'Exemple 4.

Au lieu de construire la structure d'ADN décrite dans l'Exemple 4, un fragment d'ADN portant les gènes *aphIII-treA-gdhA* a été directement "amplifié" par la technique de "Polymerase Chain Reaction" ou PCR (Ausubel et al., 1987) à partir du génome de la souche COM2218 obtenue dans l'Exemple 4. Pour cela, deux oligo-nucléotides spécifiquement homologues au début du gène *aphIII* (séquence 5'GATTATCCCGGGGTATGAAAACGA3') et à la fin du gène *gdhA* (séquence 5'GCACCGCACAGATGCATTAACCCAT3') ont été utilisés. Le fragment d'ADN linéaire ainsi obtenu a été circularisé (T4 DNA Ligase) puis introduit dans la souche COM2262 par électrotransformation. Après sélection et isolement sur milieu complet additionné de kanamycine, chaque colonie a ensuite été cultivée individuellement sur milieu BMCtre. De cette façon, la souche COM2386 a été retenue car elle présentait une vitesse de croissance importante sur ce milieu. Un dosage de l'activité tréhalase sur le surnageant de culture de la souche COM2386 a confirmé la forte expression du gène *treA* (Tableau 8).

La structure génique de la souche COM2386 a aussi été vérifiée par la technique de "Southern blot". Outre la localisation de l'intégration des gènes *aphIII-treA-gdhA* au locus *gdhA* de la souche, cette analyse a également démontrée que les gènes *aphIII-treA-gdhA* étaient amplifiés six fois dans une structure en tandem comme attendue. Ainsi, la souche COM2386 présente des caractéristiques similaires à celle de la souche COM2218A14 construite dans l'Exemple 4.

25

~~Les capacités fermentaires de la souche COM2386 ont été testées~~ comme décrit pour la souche COM2218A14. Les améliorations apportées par l'utilisation de la souche COM2386 sont indiquées dans le Tableau 9 : absence de tréhalose résiduel dans le milieu de culture après fermentation et augmentation du rendement carbone de production de glutamate. Ces résultats sont identiques à ceux obtenus avec la souche COM2218A14.

30

CONCLUSIONS

Les différentes constructions plasmidiques ou intégratives réalisées permettent l'expression du gène *treA* d'*E.coli* dans diverses souches de corynébactéries. Grâce à cette nouvelle fonction enzymatique les souches bactériennes ainsi transformées, ont la capacité d'hydrolyser le tréhalose en glucose qui est alors consommé. De ce fait, les rendements de production en acide glutamique sont significativement plus élevés avec de telles souches de corynébactéries.

TABLEAU 1

Croissance de diverses souches de *C. glutamicum* transformées ou non par le plasmide pFW3 sur milieu minimum synthétique du glucose comme seule source de carbone (BMCglu) ou du tréhalose (BMCtre).

	Souche et plasmide/Croissance	BMCglu	BMCtre
20	ATCC17965	+++	-
	ATCC17965(pFW3)(I-1676)	+++	+++
	COM1010	+++	-
	COM1010(pFW3)	+++	+++
	COM2262	+++	+/-
25	COM2262(pFW3)	+++	+++

- : absence de croissance
 +++ : croissance maximale après une nuit de culture
 +/- : croissance résiduelle après 3 nuits de culture
- 30 BMCglu : BMC additionné de glucose comme seule source de carbone
 BMCtre : BMC additionné de tréhalose comme seule source de carbone

TABLEAU 2

Activité spécifique tréhalase présente dans le milieu de culture de la souche ATCC17965 transformée par le plasmide pFW3

5

Souche	Activité spécifique
ATCC17965	$\leq 3,628$
ATCC17965(pFW3)(I-1676)	383,618(1) $\pm 10,830$

10 L'activité spécifique est exprimée en nmoles de tréhalose hydrolysées par heure pour 1 ml de culture à $DO_{650nm}=1$.

(1) : moyenne de 6 mesures

TABLEAU 3

15

Performances fermentaires de la souche ATCC17965 de *C. glutamicum* transformée par le plasmide pFW3 comparées à la même souche non transformée

20

Souche	Tréhalose en g/l	Rendement en %
ATCC17965	12,0	51,4
ATCC17965(pFW3) (I-1676)	405	57,2

25

Le milieu de fermentation contient de la mélasse de betterave en pied ainsi que dans l'alimentation. Le rendement en C12 est calculé sur saccharose. Le surfactant utilisé est le Tween 40.

30

La fermentation est réalisée de la manière suivante : 100 ml de milieu, disposés en fiole de 500 ml, sont inoculés à partir d'une colonie en croissance sur milieu gélosé (Brain Heart Infusion) additionné ou non de 25 μ g/l de kanamycine selon la présence de pFW3 dans la souche. Le milieu est composé de mélasse de betterave (80 g/l), H_3PO_4 à 75 % (4 g/l),

(NH₄)₂SO₄ (2 g/l), MgSO₄ · 7H₂O (1 g/l), urée (8 g/l), biotine (50 µg/l), pH ajusté à 5,3, plus 100 µg/ml de néomycine pour les souches transformées par pFW3. La préculture est réalisée à 32°C puis arrêtée lorsque la DO à 650 nm est comprise entre 25 et 30. A partir de cette préculture est
5 ensemencée à 3% une nouvelle culture réalisée dans les mêmes conditions de milieu et de croissance. Cette culture est arrêtée comme précédemment. Cette culture permet d'ensemencer à 5% 750 ml de milieu pied fermenteur disposés en fermenteur 2 l. Le milieu est identique à celui décrit
10 précédemment excepté l'absence d'urée et les concentrations de mélasse de betterave et de biotine, fixées respectivement à 150 g/l et 500 µg/l. Durant la fermentation, le pH est maintenu à 7,8 à l'aide d'ammoniaque. La température est initialement fixée à 34°C. Lorsque cette culture en fermenteur atteint une DO à 650 nm comprise entre 20 et 25 sont
15 additionnés au milieu 3g/l de Tween 40 et la température du fermenteur est augmentée à une valeur de 38°C. Afin d'assurer une constante présence de sucres fermentescibles, le fermenteur est alimenté par de la mélasse de betterave. La fermentation est ainsi poursuivie sur une durée totale de 24H. La concentration en acide glutamique et celle de sucre
20 résiduel dans le milieu de culture permet de calculer le rendement de fermentation, soit la quantité d'acide glutamique produit divisée par la quantité totale de sucre consommé. L'acide glutamique, les sucres résiduels et le tréhalose sont dosés par HPLC.

TABLEAU 4

25

Performances fermentaires de la souche COM1010 de *C. glutamicum* transformée par le plasmide pFW3 comparées à la même souche non transformée

30

Souche	tréhalose en g/l	Rendement en %
COM1010	8,9	46,2
COM1010(pFW3)	<05	50,2

35

Le milieu de fermentation contient de la mélasse de canne en pied ainsi que dans l'alimentation à hauteur de 20 %. Le surfactant utilisé est le Tween 40.

- 5 La fermentation est réalisée comme celle décrite Tableau 3 excepté les différences suivantes : la mélasse de betterave est substituée par de la mélasse de canne et la biotine est omise dans le milieu de préculture et de culture. Dans le milieu fermenteur, 240 g/l de mélasse de canne remplacent la mélasse de betterave et la biotine est également omise.
- 10 L'alimentation est composée d'un sirop de glucose additionné de 20 % de mélasse de canne.

TABLEAU 5

- 15 Performances fermentaires de la souche COM2262 de *C. glutamicum* transformée par le plasmide pFW3 comparées à la même souche non transformée

20		Tréhalose en g/l	Rendement en %
	Souche		
	COM2262	13,8	44,9
25	COM2262 (pFW3)	40,5	53,5

- 30 La fermentation est réalisée comme celle décrite Tableau 3 excepté les différences suivantes : la mélasse de betterave est substituée par du glucose 30 g/l et 30 g/l d'hydrolysat HCl de maïs et la biotine est ajustée à 300 µg/l dans le milieu de préculture et de culture. Dans le milieu fermenteur, 65 g/l de glucose et 20 ml/l d'hydrolysat HCl de soja remplacent la mélasse de betterave et la biotine est ajustée à 300 µg/l.
- 35 L'alimentation est composée d'un sirop de glucose pur.

TABLEAU 6

Activité spécifique tréhalase présente dans le milieu de culture des souches COM1010, COM2218 et COM2218A14

5

10

Souche	Activité spécifique
COM1010	≤ 10
COM2218	65
COM2218A14	191

L'activité spécifique est exprimée en nmoles de tréhalose hydrolysées par heure pour 1ml de culture à $DO_{650nm} = 1$.

15

TABLEAU 7

Performances fermentaires des souches COM1010, COM2218 et COM2218A14 possédant respectivement aucune, une et six copies du gène *treA* intégrées dans leur génome

20

25

Souche	Tréhalose en g/l	Rendement en %
COM1010	16,9	47,9
COM2218	11,2	49,7
COM2218A14	<20	51

30

La fermentation est réalisée comme celle décrite Tableau 4 excepté que les différents milieux utilisés ne contiennent pas d'antibiotiques.

TABLEAU 8

Activité spécifique tréhalase dans le milieu de culture des souches COM2262 et COM2386

5

10

Souche	Activité spécifique
COM2262	$\leq 26,9$ $\pm 4,5$
COM2386	653 ± 226

15

L'activité spécifique est exprimée en nmoles de tréhalose hydrolysées par heure pour 1 ml de culture à $DO_{650nm} = 1$.

TABLEAU 9

20

Performances fermentaires des souches COM2262 et COM2386 possédant respectivement aucune et six copies du gène *treA* intégrées dans leur génome

25

30

Souche	Tréhalose en g/l	Rendement en %
COM2262	16,9 $\pm 2,9$	44,6 $\pm 1,4$
COM2386	0,6 $\pm 0,8$	51,3 $\pm 0,9$

35

La fermentation est réalisée comme celle décrite Tableau 5 excepté que les différents milieux utilisés ne contiennent pas d'antibiotiques.

REFERENCES

1. AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A. and STRUHL, K. (1987). Current Protocols in Molecular Biology. Published by Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New-York.
5
2. BECERRA DE LARES, L., RATOUCNIAK, J. and CASSE F. (1977). Chromosomal Location of Gene Governing the Trehalose Utilisation in *Escherichia coli* K12. Mol. Gen. Genet., 152, 105-108.
10
3. BONAMY, C., GUYONVARCH, A., REYES, O., DAVID, F. and LEBLON, G. (1990). Interspecies Electrotransformation in *Corynebacteria*. FEMS Microbiol. Letters, 66, 263-270.
15
4. BOOS, W., EHNMANN, U., BREMER, E., MIDDENDORF, A. and POSTMA, P. (1987). Trehalase of *Escherichia coli*. Mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high osmolarity growth conditions. J. Biol. Chem., 262, 13212-13218.
20
5. FRINGS, E., KUNTE, H.J. and GALINSKI, E.A. (1993). Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: Occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. FEMS Microbiol. Letters, 109, 25-32.
25
6. GUTIERREZ, C., ARDOUREL, M., BREMER, E., MIDDENDORF, A., BOOS, W. and EHMAN, U. (1989). Analysis and DNA sequence of the osmoregulated *treA* gene encoding the periplasmic trehalase of *Escherichia coli* K12. Mol. Gen. Genet., 217, 347-354.
30
7. KIENTLE, I., BURGERT, M. and HOLZER, H. (1993). Assay of Trehalose with Acid Trehalase Purified from *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 9, 607-611.
35

8. LABARRE, J., REYES, O., GUYONVARCH, A. and LEBLON, G. (1993). Gene Replacement, Integration and Amplification at the *gdhA* locus of *Corynebacterium glutamicum*. J; Bact., 175, 1001-1007.
- 5 9. LIEBL, W., KLAMER, R. and SCHLEIFER, K. H. (1989). Requirement of chelating compounds for the growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic media. Applied Microbiology and Biotechnology 32, 205-210.
- 10 10. LIEBL, W., SINSKEY, A. J. and SCHLEIFER, K.-H. (1992). Expression, Secretion, and Processing of Staphylococcal Nuclease by *Corynebacterium glutamicum*. J. Bact., 174, 1854-1861.
- 15 11. MARQUET, M., URIBELARREA, J.L., HUCHENQ, A., LANEELLE, G. and GOMA, G. (1986). Glutamate excretion by *Corynebacterium glutamicum* : a study of glutamate accumulation during a fermentation course. Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 220-223.
- 20 12. REYES, O., GUYONVARCH, A., BONAMY, C., SALT, V., DAVID, F. and LEBLON, C. (1991). "Integron"- bearing vectors : a method suitable for stable chromosomal integration in highly restrictive Corynebacteria. Gene, 107, 61-68.
- 25 13. ROSE, R., E (1988). The nucleotide sequence of pACYC184, Nucleic Acids Res., 16, 355.
- 30 14. SANTAMARIE, R., CHU, J., A., MESAS, J., M. and Martin, J., F (1984) Characterization of endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. J. Gen. Microbiol., 130, 2238-2246.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de production d'un acide aminé par fermentation d'un milieu de culture comprenant des sucres, à l'aide d'une souche de corynébactérie produisant ledit acide aminé, caractérisé en ce qu'on utilise une souche recombinante de corynébactérie transformée de manière à exprimer une activité enzymatique hydrolysant le tréhalose.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite souche recombinante de corynébactérie exprime et sécrète dans le milieu de culture une activité tréhalase hydrolysant le tréhalose en glucose.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite souche de corynébactérie est transformée par un plasmide répliatif comportant une cassette d'expression et de sécrétion d'un fragment d'ADN codant pour une dite enzyme tréhalase.

4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que ladite souche est transformée par un vecteur d'intégration chromosomique d'une cassette d'expression et de sécrétion d'un fragment d'ADN codant pour une dite enzyme tréhalase.

5. Procédé selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce que lesdits fragments d'ADN assurant l'expression et la sécrétion de l'enzyme tréhalase sont constitués par les fragments d'ADN assurant l'expression et la sécrétion de la tréhalase dans l'hôte d'origine de ladite tréhalase.

6. Procédé selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que l'enzyme tréhalase est une enzyme tréhalase de *E.coli*.

7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ladite souche est transformée par le gène *treA* de *E.coli* dans sa totalité.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit acide aminé est l'acide glutamique.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit acide aminé est la lysine.

5 10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que ladite souche est du genre Corynebacterium ou Brevibacterium.

10 11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que ladite souche est choisie parmi une souche de C. glutamicum, C. crenatum, C. melassecola ou B. lactofermentum.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ladite souche est une souche de C. glutamicum déposée à la CNCM sous le N° I-1676.

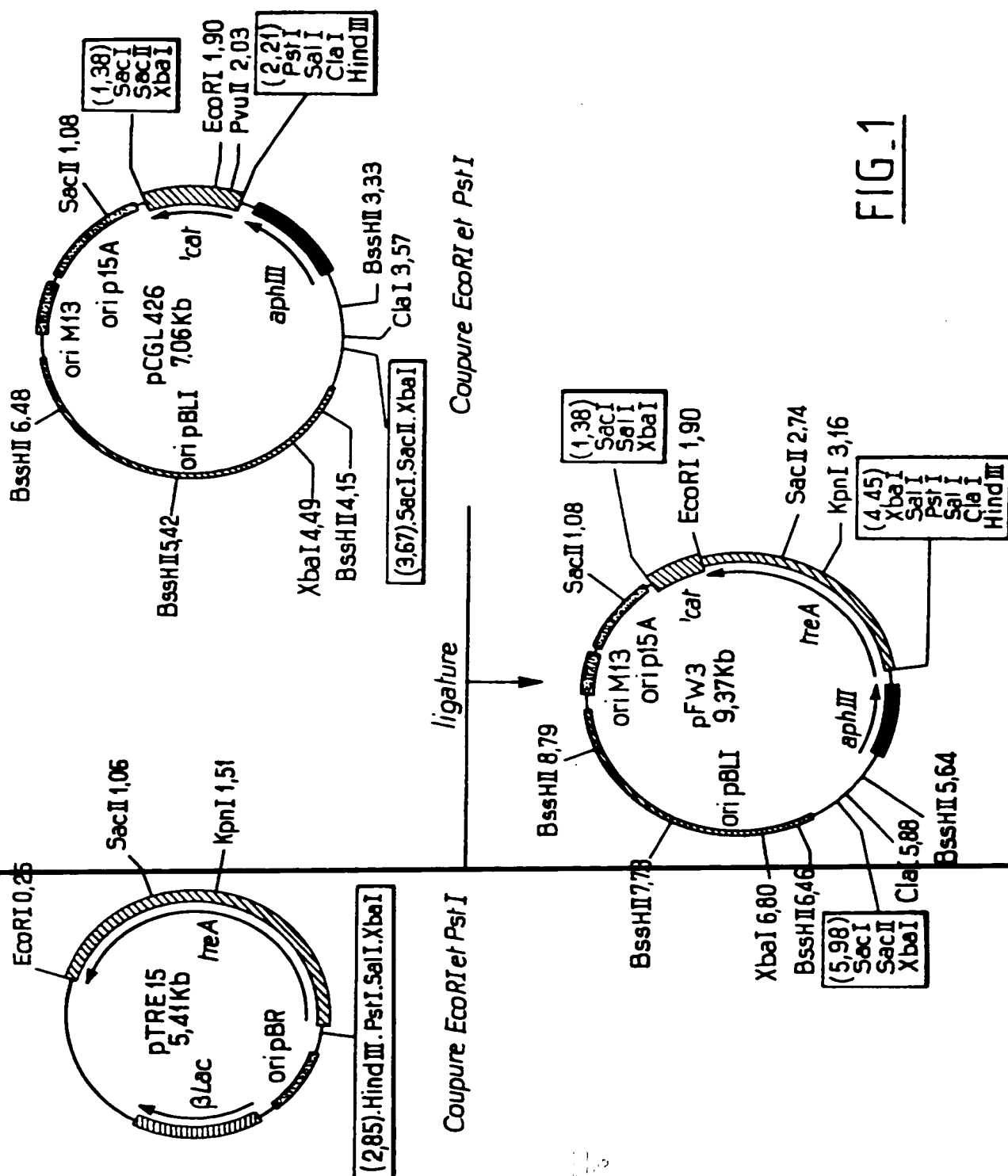
15 13. Procédé selon l'une des revendications 3 à 12, caractérisé en ce que ladite souche est transformée par un fragment d'ADN en multi-copie codant pour l'enzyme tréhalase.

20 14. Procédé selon l'une des revendications 4 à 13, caractérisé en ce que ladite souche de corynébactérie est transformée par un vecteur d'intégration comportant :

- un gène assurant une sélection efficace dans ladite corynébactérie ;
- une séquence identique ou partiellement homologue du génome de
- 25 ladite corynébactérie, et
- ~~ladite cassette d'expression du fragment d'ADN codant pour~~ l'enzyme tréhalase et sa sécrétion dans le milieu de culture.

30 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que ladite souche est une souche de C. glutamicum transformée par recombinaison homologue au locus *gdhA* du chromosome de ladite souche à l'aide d'un vecteur d'intégration contenant les gènes *aphIII-treA-gdhA*.

1 / 4



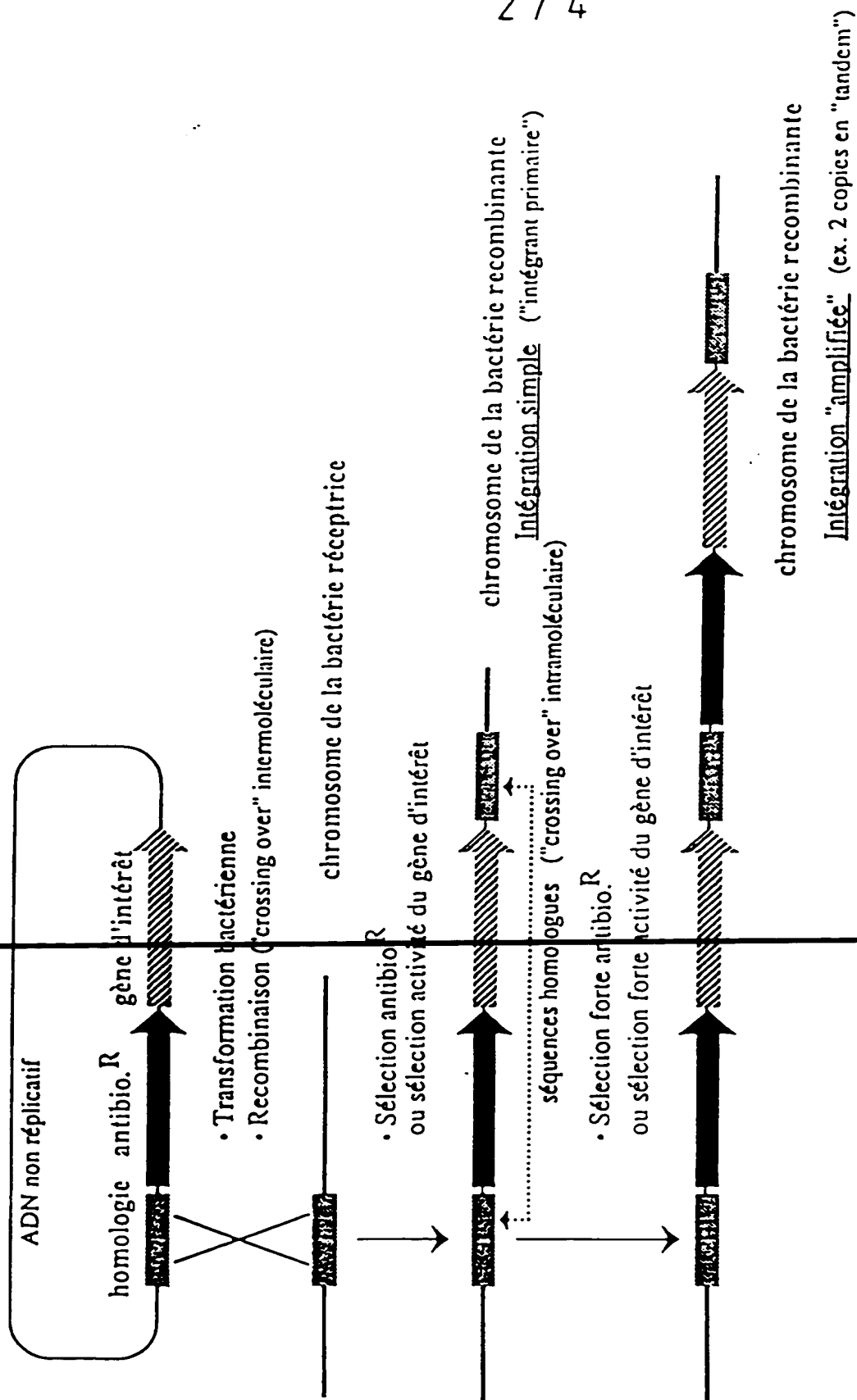


FIG. 2:

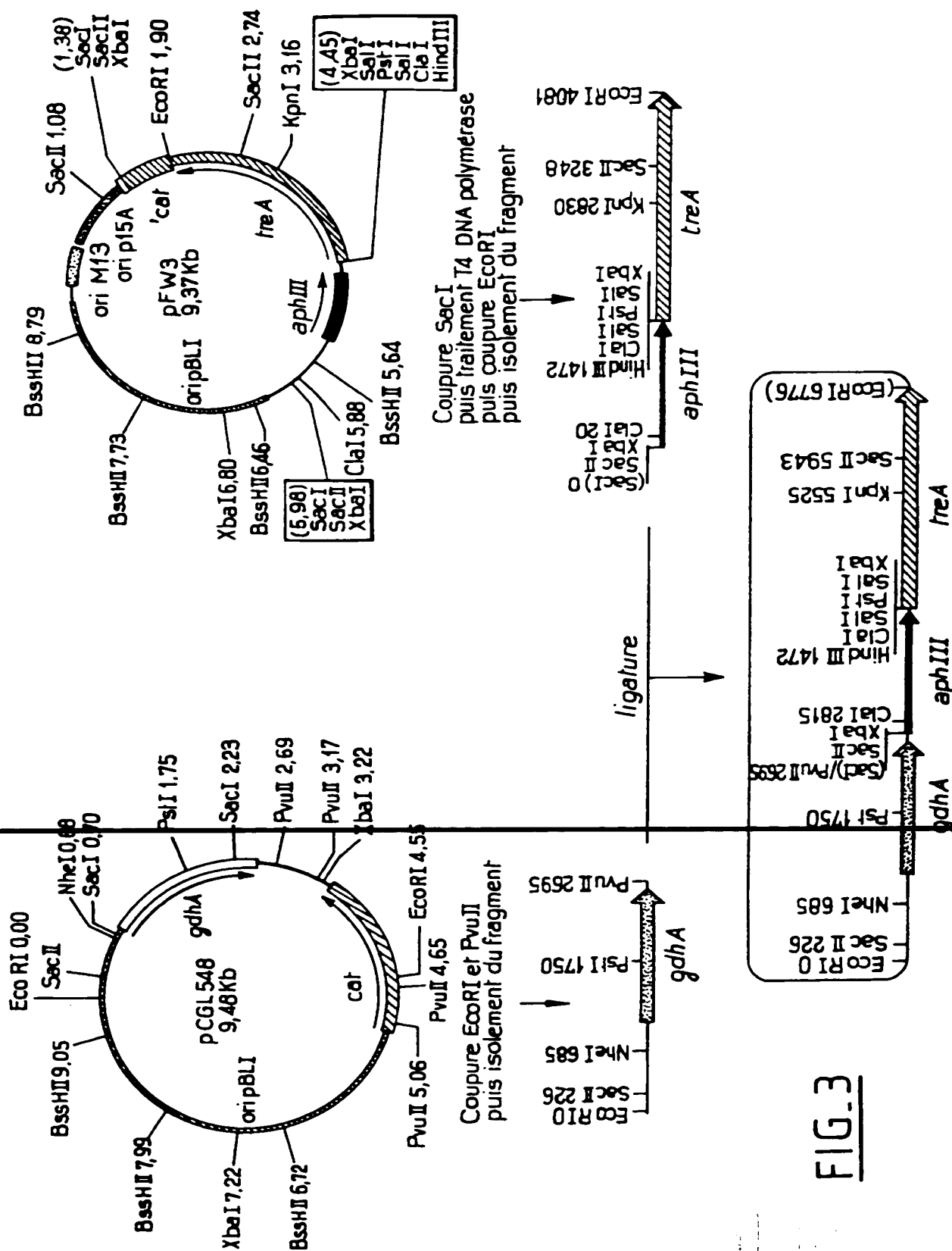


FIG. 3

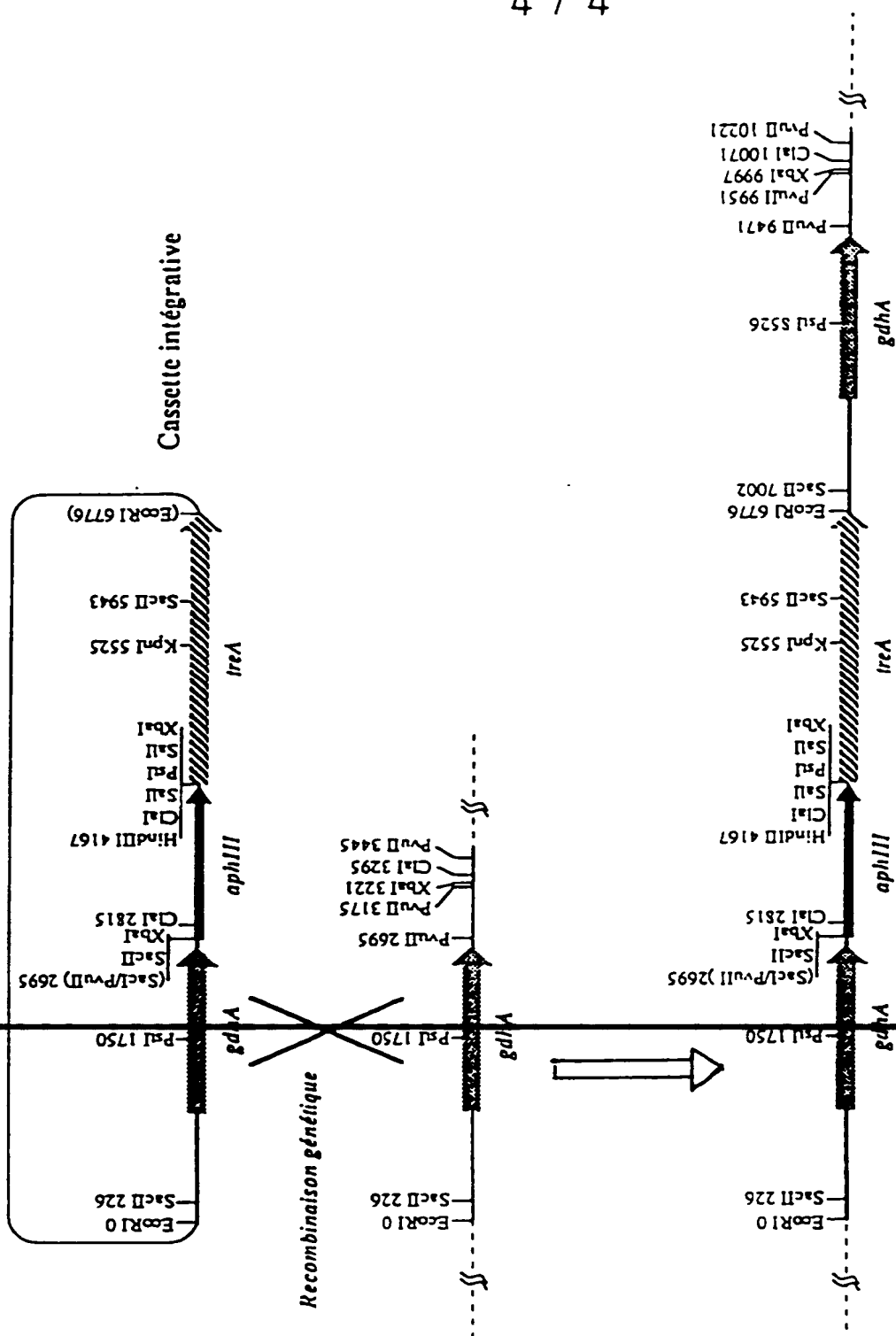


FIG. 4

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche2747131
N° d'enregistrement
nationalFA 528324
FR 9604415

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y,D	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9208 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 92-060502 XP002022115 & JP-A-04 004 888 (AJINOMOTO KK) , 9 Janvier 1992 * abrégé *</p> <p>---</p>	1-8, 10-12, 14,15
Y	<p>CRIT REV BIOTECHNOL, 1995, 15 (1) P73-103, UNITED STATES, XP000613291 JETTEN MS ET AL: "Recent advances in the physiology and genetics of amino acid-producing bacteria." * page 74 - page 77 * * page 85 - page 89 *</p> <p>---</p>	1-8, 10-12, 14,15
Y,D	<p>J BIOL CHEM, SEP 25 1987, 262 (27) P13212-8, UNITED STATES, XP002022113 BOOS W ET AL: "Trehalase of Escherichia coli. Mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high osmolarity growth conditions." * le document en entier *</p> <p>---</p>	1-8, 10-12, 14,15
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 112, no. 17, 23 Avril 1990 Columbus, Ohio, US; abstract no. 156731, NAGAYAMA, KOZO ET AL: "Thermostable trehalase of Corynebacterium and its manufacture with recombinant Escherichia"</p> <p>---</p>	1-8, 10-12, 14,15
	<p>XP002022114 * abrégé * & JP-A-01 225 485 (RESEARCH DEVELOPMENT CORP. OF JAPAN, JAPAN)</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
7 Janvier 1997		Gurdjian, D
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2

EPO FORM 130 (01.92) (P0C13)

RAPPORT DE RECHERCHE PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2747131

N° of registration
national

FA 528324

FR 9604415

[illegible]